

Mikrobielle Hydroxylierungen an Cardenoliden und
Bufadienoliden, ein Beitrag zur Substratspezifität
von *Fusarium lini* (BOLLEY)

Teildruck der

INAUGURALDISSERTATION

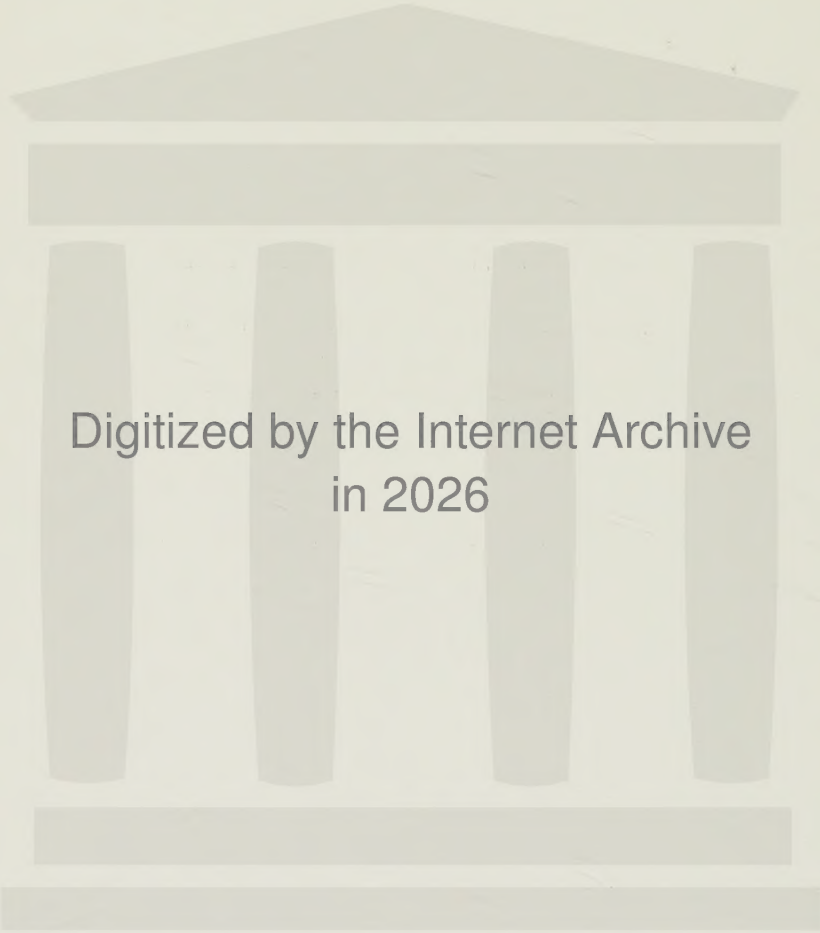
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

MARTIN SCHÜPBACH

aus Basel (Schweiz)

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546702_0023

Mikrobielle Hydroxylierungen an Cardenoliden und
Bufadienoliden, ein Beitrag zur Substratspezifität
von *Fusarium lini* (BOLLEY)

Teildruck der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

MARTIN SCHÜPBACH

aus Basel (Schweiz)

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1965

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren Dr. CH. TAMM und Dr. C. A. GROB.

Basel, den 29. Juni 1965

Prof. Dr. H. ANNAHEIM
Dekan

Herrn MARTIN SCHÜPBACH wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 29. Juni 1965 erlaubt, diesen Teildruck seiner am 29. Juni 1965 genehmigten Inauguraldisser-
tation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

*«Mikrobielle Hydroxylierungen an Cardenoliden und Bufadienoliden,
ein Beitrag zur Substratspezifität von Fusarium lini (BOLLEY)»*

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Institut für Organische Chemie an der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.



Umwandlung von Krötengiften (Bufadienoliden) durch Mikroorganismen.

II. 12 β -Hydroxyresibufogenin¹⁾

12. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]²⁾

Die Umwandlung von digitaloiden Lactonen (Cardenoliden) durch Mikroorganismen ist in den letzten Jahren eingehend studiert worden [3]. Das Verhalten der Steroid-Krötengifte (Bufadienolide) gegenüber den mikrobiellen Enzymen wurde jedoch kaum untersucht. TAMM & GUBLER [4] stellten lediglich fest, dass Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) Bufalin und 3-Dehydrobufalin in der 12 β -Stellung zu hydroxylieren vermögen. Die beiden Bufadienolide verhielten sich gegenüber diesem Organismus somit gleich wie die analogen Substrate der Cardenolidreihe. Die Natur des an C-17 haftenden Lactonrings beeinflusste die Reaktionen nicht. Auf Grund dieser und weiterer Befunde [5] schlossen wir, dass für den Angriffsort der Hydroxylase von *F. lini* die Stereochemie des Steroidskeletts, insbesondere die *cis*-Verknüpfung der Ringe C und D ausschlaggebend ist. Alle bisher untersuchten Verbindungen der C/D-*cis*-Reihe enthielten aber noch eine Hydroxylgruppe in 14-Stellung. Um ihren Einfluss abzuklären, war es wünschenswert, das Verhalten von Substraten kennenzulernen, die an Stelle des 14 β -Hydroxyls ein H-Atom oder eine 14 β , 15 β -Epoxygruppe besitzen. Entsprechende 14-Desoxycardenolide und -Bufadienolide sind, abgesehen von 14 β -Artebufogenin [5a], das aber noch eine 15-Ketogruppe enthält, nicht bekannt; hingegen enthalten Resibufogenin (**1**) und 14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digi-

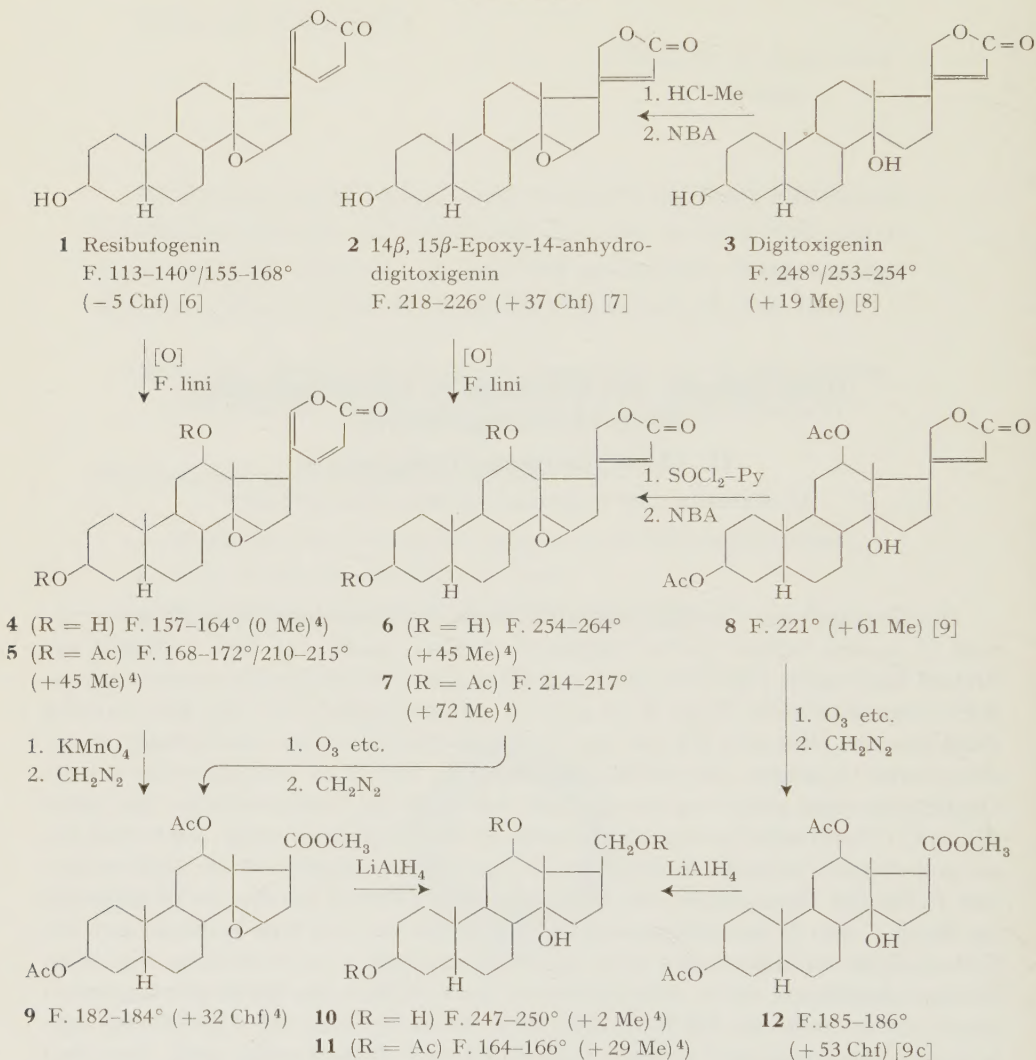
¹⁾ Über diese Untersuchungen wurde am «International Symposium on the Chemistry of Natural Products», Kyoto, Japan, 12. – 18. April 1964, berichtet [2].

²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2225.

toxigenin (2) einen Oxiraning in der gewünschten Stellung. Im folgenden berichten wir über die Resultate, die bei der Inkubation dieser beiden Verbindungen mit wachsenden Kulturen von *F. lini* erzielt wurden³⁾.

Die mikrobiologischen Umsetzungen wurden, wie früher beschrieben [4] [5], in Schüttelkulturen unter aeroben Bedingungen bei 25–27° durchgeführt. Der Reaktions-

Formelschema



Ac = CH₃CO–; NBA = N-Bromacetamid; Chf = Chloroform; Me = Methanol; Py = Pyridin.

Die Zahlen in runden Klammern geben die spez. Drehungen für Na-Licht an.

³⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. KUNO MEYER, Basel, für die grosszügige Überlassung einer grösseren Menge Resibufogenin herzlich danken.

⁴⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

verlauf wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatogrammen verfolgt, die Produkte durch Chromatographie an Silicagel oder Kieselgel gereinigt und in üblicher Weise charakterisiert bzw. indentifiziert.

Resibufogenin (**1**) ergab nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen in ca. 60-proz. Ausbeute ein krist. Reaktionsprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm einheitlich war und langsamer als **1** lief⁵⁾. Nach dem UV.-Spektrum ($\lambda_{\max} = 298 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,76$) war der Lactonring intakt geblieben. Die Analysenwerte deuteten auf die Formel $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ eines Monohydroxyderivats von **1** hin. Auf Grund der Abbaureaktionen (s. unten) kommt ihm die Struktur des noch unbekannten 12β -Hydroxyresibufogenins (**4**) zu⁶⁾. Bei der Behandlung mit Acetanhydrid in Pyridin bei 37° wurde das Di-O-acetylderivat **5** ($\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_7$) erhalten, das im IR. keine HO-Schwingungen mehr aufwies (vgl. Fig. 1). Um die Stellung der neu eingetretenen HO-Gruppe abzuklären, wurde das Di-O-acetylderivat **5** mit KMnO_4 in Aceton abgebaut. Die sauren Anteile der Oxydationsprodukte lieferten nach Behandlung mit Diazomethan in Äther den krist. 3β , 12β -Diacetoxy- $14,15\beta$ -epoxy- 5β , 14β , 17α H-ätiensäure-methylester (**9**). Das IR.-Spektrum (in KBr) (vgl. Fig. 3) von **9** zeigte keine HO-Bande, wies jedoch bei $3,31 \mu$ die typische CH-Schwingung des am Oxiranring haftenden 15α H-Atoms auf [10]. Die Behandlung des Esters **9** mit LiAlH_4 führte unter Öffnung des Oxidrings und reduktiver Spaltung aller Esterbindungen zum Tetrol **10**. Mit Acetanhydrid und Pyridin lieferte es ein Tri-O-acetylderivat **11**, dessen IR.-Spektrum an Stelle der C-H-Schwingung des Epoxids eine freie HO-Bande bei $2,86 \mu$ zeigte. Das gleiche Tetrol **10** wurde durch LiAlH_4 -Reduktion des bekannten 3β , 12β -Diacetoxy- 14 -hydroxy- 5β , 14β , 17α H-ätiensäure-methylesters **12** erhalten, der durch O_3 -Abbau von Di-O-acetyl-digoxigenin (**8**) leicht zugänglich ist. Auch das aus diesem Tetrol bereitete Tri-O-acetylderivat **11** war identisch mit dem durch den Abbau von 12β -Hydroxyresibufogenin (**4**) erhaltenen Präparat.

Die Umsetzung von 14β , 15β -Epoxy- 14 -anhydro-digitoxigenin (**2**)⁷⁾ mit *Fusarium lini* ergab nach Inkubation während 9 Tagen, in 50–60-proz. Ausbeute, wieder ein einziges krist. Reaktionsprodukt⁵⁾, dessen Analysenwerte auf die Formel $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ eines Monohydroxyderivats von **2** passten. Auch hier war nach dem UV.-Spektrum ($\lambda_{\max} = 214 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 4,17$) der Lactonring unversehrt geblieben. Es liegt das noch unbekannte 14β , 15β -Epoxy- 14 -anhydro-digoxigenin (**6**) vor. Der Strukturbeweis wurde wie folgt erbracht: Mit Acetanhydrid-Pyridin lieferte **6** das Di-O-acetylderivat, dessen IR.-Spektrum wieder die für den 14β , 15β -Oxiranring typische C-H-Schwingung des 15α -H-Atoms bei $3,31 \mu$, jedoch keine Hydroxylbande aufwies. Wurde nun Di-O-acetyldigoxigenin (**8**) mit SOCl_2 -Pyridin bei -15° und das gebildete 14 -Anhydroderivat mit N-Bromacetamid in Aceton-Wasser analog zu den Angaben von Hofer *et al.* [7] behandelt, so resultierte Di-O-acetyl- 14β , 15β -epoxy- 14 -anhydro-digoxigenin (**7**),

⁵⁾ Das Dünnschichtchromatogramm des Rohextrakts liess mindestens vier weitere, allerdings sehr schwache Flecke erkennen. Es wurde nicht versucht, diese Spuren von Nebenprodukten zu isolieren.

⁶⁾ Da 12β -Hydroxyresibufogenin (**4**) stark hygroskopisch ist, lieferten die C,H-Bestimmungen keine befriedigenden Analysenwerte. Die Analysenresultate des Di-O-acetylderivats **5** und aller weiteren Reaktionsprodukte stimmten jedoch mit den postulierten Formeln sehr gut überein.

⁷⁾ II ist nach Hofer *et al.* [7] aus Digitoxigenin (**3**) durch Wasserabspaltung mit HCl-Methanol und anschliessende Epoxydation mit N-Bromacetamid leicht erhältlich.

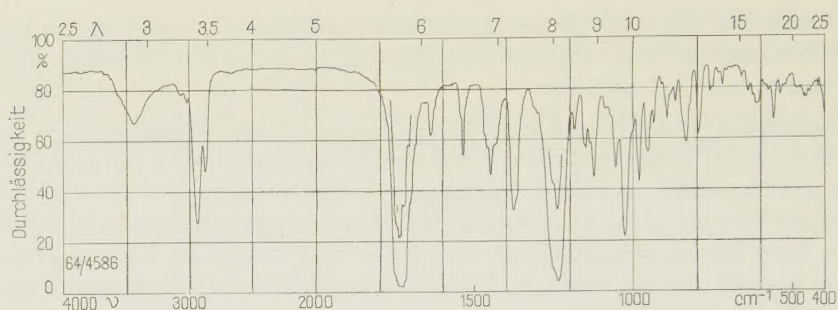


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Di-O-acetyl-12 β -hydroxy-resibufogenin (**5**) fest in KBr⁸⁾

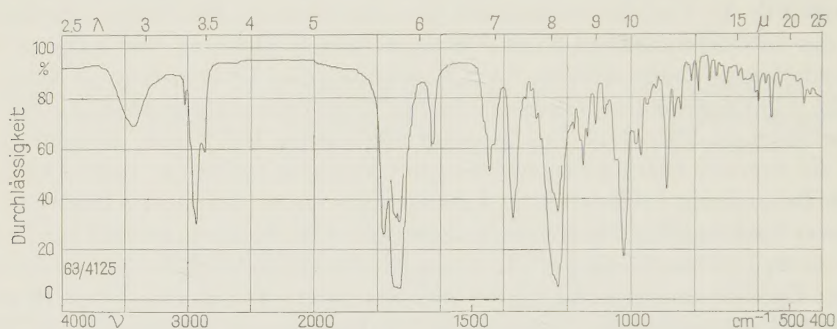


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Di-O-acetyl-14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin (**7**) fest in KBr⁸⁾

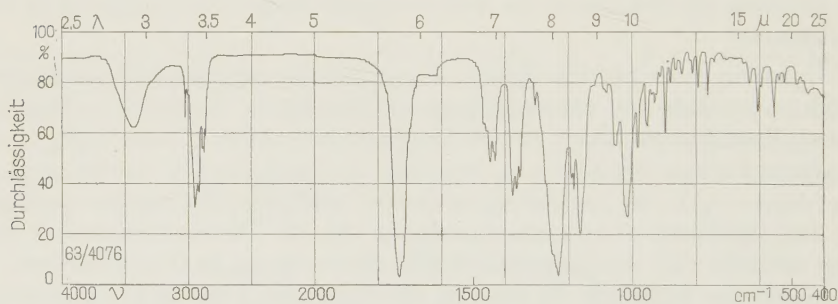


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von 3 β ,12 β -Diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-ätiansäure-methylester (**9**) fest in KBr⁸⁾

das mit dem obigen durch Hydroxylierung und Acetylierung von **2** erhaltenen Präparat identisch war. Zur Sicherheit wurde **7** mit Ozon abgebaut⁹⁾. Der aus den sauren Anteilen mit Diazomethan resultierende Methylester war identisch mit dem durch den oxydativen Abbau erhaltenen 3 β ,12 β -Diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-ätiansäure-methylester (**9**). Damit ist 12 β -Hydroxy-resibufogenin (**4**) nochmals mit Digoxigenin verknüpft worden.

⁸⁾ Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125, im Spektallabor des Instituts (CH. SENN und W. SCHWAB).

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, dass sich die 14 β , 15 β -Epoide bei der Hydroxylierung durch *F. lini* gleich wie die Substrate mit einer 14 β -Hydroxygruppe verhalten. Für die bei beiden Strukturtypen beobachtete 12 β -Hydroxylierung ist, wie angenommen, ausschliesslich die cis-Verknüpfung der Ringe C und D massgebend.

Herr Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, war so freundlich, die Toxizität von 12 β -Hydroxy-resibufogenin (4), 14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (6) und von 14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin an der Katze nach HATCHER-BRODY zu prüfen¹⁰⁾. Seine Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt, wo zum Vergleich noch der Wert von Resibufogenin (1) aufgeführt ist. Aus den Zahlen der Tabelle geht hervor, dass 12 β -Hydroxyresibufogenin (4) deutlich, wenn auch schwach, wirksam ist, während alle anderen 14 β , 15 β -Oide, sowohl der Cardenolid- wie auch der Bufadienolidreihe, inaktiv sind.

Toxizität an der Katze

Substanz	Geometrisches Mittel der letalen Dosis (Katze) in mg/kg (= 1 Katzeinheit)
12 β -Hydroxyresibufogenin (4)	3,378–4,583 ¹¹⁾
Resibufogenin (1)	inaktiv [6a]
14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (6)	> 11,273
14 β , 15 β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2)	> 5,88

Dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN (Projekt Nr. 2535) danken wir für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze etwa $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Messung der Spektren und der spez. Drehungen wurden ca. 1 Std. bei 0,02 Torr/60–70° und zur Elementaranalyse 5 Std. bei 0,01 Torr/110° mit Einwaage im Schweinchen getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (Leitung E. THOMMEN). Die Adsorptionschromatographien wurden nach der Durchlaufmethode [11] an Silicagel (SiO₂, Korngrösse 0,15–0,30 mm) und nach DUNCAN [12] an Kieselgel (SiO₂, Korngrösse 0,05–0,2 mm) durchgeführt. Dünnschichtchromatographie (= DC) mit Kieselgel als Adsorbens nach STAHL [13]. Entwickeln der Flecke durch Besprühen mit 20-proz. SbCl₃-Lösung in Chloroform [14]. Abkürzungen: Me = Methanol, Md = Methylenchlorid.

2. *Kultur der Mikroorganismen.* – *Kulturen.* Proben einer Schrägagarkultur von *Fusarium lini* (BOLLEY) (Herkunft: CENTRALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Baarn, Niederlande (CBS)) wurden direkt als Impfmateriel für die Nährlösung verwendet oder zur Sporulierung auf Reismährmedium (13 g polierter Reis und 25 ml Wasser im ERLNMEYER-Kolben von 500 ml sterilisiert) überimpft. Im letzteren Falle wurde eine wässrige Suspension der drei Wochen alten, bei 27° inkubierten Kulturen als Impfmateriel verwendet. Zum Versuch wurden 100 ml-ERLNMAYER-Kolben mit je 20 ml Nährlösung benutzt. Die Gefässe wurden 30 Min. bei 120° im Dampfautoklav sterilisiert und dann beimpft. Die ERLNMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) bei 27° 3–10 Tage inkubiert, worauf das in Aceton gelöste Substrat nach Sterilfiltration zugegeben wurde.

⁹⁾ Auffallenderweise musste die Essigesterlösung von 7 viel länger und bei höherer Temperatur als üblich mit Ozon behandelt werden.

¹⁰⁾ Wir möchten Herrn Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, Ind. USA, für diese Bestimmungen bestens danken.

¹¹⁾ Werte bestimmt an 2 Katzen, die kontinuierlichen Tremor zeigten. Mäuse zeigten nach der intravenösen Injektion Hyperaktivität, Tremor und Konvulsionen.

Nährlösung nach CZAPEK: 30 g Saccharose; 3,0 g NaNO_3 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KCl und 10 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mit dest. Wasser ad 1000 ml; pH auf 7,3 eingestellt.

3. *Umsetzung von Resibufogenin (1) mit Fusarium lini*. Eine Lösung von 500 mg Resibufogenin (1) vom Smp. $90^\circ/160\text{--}170^\circ$ in 69 ml Aceton wurde, gleichmässig verteilt, steril zu 69 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben und 10 Tage bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Hierauf wurde der Inhalt jedes Kolbens mit 5 ml Methanol versetzt, 2 Std. stehengelassen und abgenutscht. Der Rückstand wurde noch zweimal analog mit Methanol behandelt. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Methanol befreit und auf ca. 800 ml eingengt. Die resultierende trübe wässrige Lösung wurde viermal mit Chloroform-Äthanol (85:15) ausgeschüttelt. Die Auszüge ergaben nach Waschen mit wenig Wasser, Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum 630 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Md-Me-(93:7)) einen starken gelbvioletten Fleck von 12β -Hydroxyresibufogenin (4) (Rf-Wert: 0,12) und 4 sehr schwache Flecke (Rf-Werte: 0,03/0,25/0,45/0,51) (vgl. Rf-Wert von Resibufogenin (1): 0,45; grün-blau) zeigte. Das Rohprodukt wurde an 35 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 70 ml Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–6 (eluiert mit Md) ergaben 103 mg gelbes Öl, verworfen.

Die Fraktionen 9–14 (eluiert mit Md-Me-(98:2)) ergaben ca. 115 mg Rohprodukt, das im DC mehrere Flecke zeigte, aber nur zum kleinsten Teil noch Edukt I enthielt.

Die Fraktionen 15–18 (eluiert mit Md-Me-(95:5)) ergaben 340 mg Rohprodukt (im DC einheitlich), das aus Aceton-Äther 300 mg Kristalle lieferte. Nach Umkristallisieren reines 12β -Hydroxyresibufogenin (3β , 12β -Dihydroxy-14,15 β -epoxy-5 β - $\Delta^{20,22}$ -bufadienolid) (4) in groben Prismen vom Smp. $157\text{--}163^\circ$ (Sintern ab 107°). Smp. der erstarrten Schmelze $158\text{--}163^\circ$ (ohne Sintern). $[\alpha]_D^{22} = 0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,090$ in Methanol). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,76$.

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (400,5) Ber. C 71,97 H 8,05% Gef. C 73,09; 70,92 H 8,62; 8,19%

4. *Di-O-acetyl-12 β -hydroxy-resibufogenin (5) aus 4*. 108 mg 4 vom Smp. $153\text{--}163^\circ$ (Sintern ab 107°) wurden mit 2 ml abs. Pyridin und 1,8 ml Acetanhydrid 24 Std. bei 37° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Benzol im Vakuum abgedampft. Es resultierten 130 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 8 g Silicagel mit Me-Md-(98:2) als Lösungsmittel gereinigt wurde. Aus Aceton-Äther resultierten 111 mg Körner vom Doppelsmp. $168\text{--}172^\circ/210\text{--}215^\circ$. $[\alpha]_D^{22} = +46^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,791$ in Methanol). Im IR.-Spektrum (in CH_2Cl_2) Banden bei $5,70\text{--}5,85 \mu$ (C=O, Cumalinring + Acetyl) und $8,10 \mu$ (-O-CO- CH_3), IR.-Spektrum (fest in KBr) Banden bei $3,31 \mu$ (CH, Epoxid); $5,78 \mu$ (breit, C=O, Cumalinring + Acetyl), $6,11 \mu$ (C=C, Cumalinring) und $8,05 \mu$ (-OCOCH $_3$).

$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_7$ (484,6) Ber. C 69,40 H 7,48% Gef. C 69,23 H 7,60%

5. *Umsetzung von 14 β ,15 β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2) mit Fusarium lini*. Eine Lösung von 500 mg 14β , 15β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2) vom Smp. $210\text{--}220^\circ$ in 80 ml Aceton wurde, gleichmässig verteilt, steril zu 80 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben und 9 Tage bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Hierauf wurden die vereinigten Kulturlösungen mit 500 ml Methanol 1 Std. geschüttelt, vom Mycel abgenutscht und dieses nach Zerkleinern nochmals mit 400 ml Methanol geschüttelt und abgenutscht. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum vom Methanol befreit und auf 500 ml eingengt. Die resultierende trübe wässrige Lösung wurde viermal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 640 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Md-Me-(93:7)) einen starken Fleck von 14β , 15β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (6) (Rf-Wert 0,15) und 6 sehr schwache Flecke (Rf-Werte: 0,05/0,20/0,24/0,36/0,42/0,55) (vgl. Rf-Wert von 14β , 15β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2): 0,42) zeigte. Das Rohprodukt wurde an 35 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 40 ml Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–7 (eluiert mit Md) ergaben 23 mg Öl, verworfen.

Die Fraktionen 8–10 (123 mg, eluiert mit Md-Me-(98:2)) lieferten aus Aceton-Äther 58 mg krist. 14β , 15β -Epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (2) vom Smp. $205\text{--}218^\circ$.

Die Fraktionen 11–13 (eluiert mit Md-Me-(96:4)) ergaben 13 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 14–20 (310 mg eluiert mit Md-Me-(96:4)) ergaben aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp. $250\text{--}262^\circ$. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther reines 14β , 15β -Epoxy-14-anhydro-

digoxigenin ($3\beta,12\beta$ -Dihydroxy-14,15 β -epoxy-5 β - $\Delta^{20(22)}$ -cardenolid) (**6**) in Prismen vom Smp. 254–264°. $[\alpha]_D^{24} = +50^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,663$ in Methanol). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{max} = 214 \text{ m}\mu$, $\log \epsilon = +1,17$.

$C_{23}H_{32}O_5$ (388,5) Ber. C 71,10 H 8,30% Gef. C 70,86 H 8,28%

6. *Di-O-acetyl-14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin* (**7**) aus **6**. 82 mg 14 β ,15 β -Epoxy-14-anhydro-digoxigenin (**6**) vom Smp. 254–264° wurden mit 3 ml abs. Pyridin und 2,7 ml Acetanhydrid 17 St. bei 40° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum vollständig eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Benzol im Vakuum abgedampft. Es resultierten 110 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 5 g Silicagel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel gereinigt wurde. Aus Aceton-Äther 90 mg Kristalle vom Smp. 212–216°. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther Prismen vom Smp. 214–217° (Sintern bei 210°). $[\alpha]_D^{28} = +72^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,319$ in Me). Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 2) (fest in KBr) Banden bei 3,31 μ (C–H, Epoxid); 5,77 μ (C=O, Acetyl+ Butenolidring); 6,13 μ (C=C, Butenolidring) und 8,13 μ (–O–COCH₃). Nach Smp., Misch-Smp., DC und IR.-Spektrum identisch mit Präparat, das aus **8** bereitet wurde (s. unten).

$C_{27}H_{36}O_7$ (472,6) Ber. C 68,62 H 7,68% Gef. C 68,38 H 7,89%

7. *Di-O-acetyl-14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin* (**7**) aus *Di-O-acetyldigoxigenin* (**8**). Eine Lösung von 524 mg **8** vom Smp. 224–228° in 2,6 ml Pyridin wurde bei –40° mit einem auf –40° gekühlten Gemisch von 2,6 ml Pyridin und 0,55 ml SOCl₂ versetzt und 100 Min. bei ca. –15° unter H₂O-Ausschluss stehengelassen. Hierauf wurde mit Eis zerlegt, die Lösung mit 2N H₂SO₄ auf pH 1 gebracht und mit Äther-Chloroform-(3:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen mit 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen resultierte 506 mg farbloses Rohprodukt, das im DC (Fließmittel Äther) praktisch nur einen Fleck zeigte. Aus Aceton-Äther kristallisierten 438 mg *Di-O-acetyl-14-anhydro-digoxigenin* vom Smp. 197–200° und 31 mg vom Smp. 189–195°. Eine Lösung von 200 mg der obigen Kristalle vom Smp. 197–200° in 9 ml Aceton wurden der Vorschrift von Hofer *et al.* [7] entsprechend mit einer Lösung von 140 mg N-Bromacetamid in 2,3 ml Wasser versetzt, worauf die Lösung sich gelb färbte. Nach Stehen während 17 Std. bei 22° hatte sich die Lösung entfärbt; sie wurde nochmals mit einer Lösung von 55 mg N-Bromacetamid in 0,5 ml Wasser versetzt. Nach 5 Std. Stehen wurde mit 7 ml Wasser verdünnt und das Aceton im Vakuum entfernt. Die wässrige Suspension wurde gründlich mit Chloroform ausgeschüttelt, die Auszüge mit 1N NaOH und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt (213 mg) wurde an 200 g Kieselgel nach DUNCAN [12] mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert (100-ml-Fractionen). Die Fraktionen 19–21 lieferten aus Äther und einer Spur Aceton 130 mg Kristalle vom Smp. 206–210°. Nach Umkristallisieren wurde reines *Di-O-acetyl-14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin* (**7**) in Prismen vom Smp. 213–216° (Sintern bei 209°) erhalten. $[\alpha]_D^{24} = +72^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,352$ in Methanol). Der Misch-Smp. mit einem Präparat von **7**, das aus **6** erhalten worden war (s. oben), war gleich, ebenso das IR.-Spektrum und die Laufstrecke im DC.

$C_{27}H_{36}O_7$ (472,6) Ber. C 68,62 H 7,68% Gef. C 68,40 H 7,61%

8. *KMnO₄-Abbau von Di-O-acetyl-12 β -hydroxy-resibufogenin* (**5**): $3\beta,16\beta$ -Diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β -ätiensäure-methylester (**9**). 105 mg **5** vom Smp. 155–163°/193–199° wurden in 7 ml frisch über KMnO₄ destilliertem Aceton gelöst und unter Rühren während 4 Std. portionsweise mit insgesamt 230 mg fein gepulvertem KMnO₄ versetzt (am Anfang 125 mg, nach 30 Min. 55 mg und nach 2 Std. 50 mg KMnO₄ zugegeben). Nach 4 Std. war die Lösung immer noch leicht rötlich. Sie wurde im Vakuum vollständig eingedampft, der Rückstand etwas zerrieben, mit 15 ml Wasser versetzt und mit 2N H₂SO₄ auf pH 1 gebracht. Unter Eiskühlung wurde SO₂ in die Suspension bis zur völligen Entfärbung eingeleitet. Die wässrige, farblose Suspension wurde 6mal mit Chloroform-Äther-(3:1) ausgeschüttelt, die Lösungen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das saure Rohprodukt (ca. 100 mg) wurde in 15 ml Äther gelöst und mit einer frisch bereiteten ätherischen Diazomethanolösung im Überschuss versetzt. Nach dem Eindampfen resultierten 95 mg roher Ester, der an 6 g Silicagel grob chromatographiert wurde (25 ml Lösungsmittel pro Fraktion). Die mit Benzol-Chloroform-(4:1) eluierten Fraktionen ergaben ca. 70 mg Rohprodukt, das im Dünnschichtchromatogramm 2–3 Flecke zeigte, die sehr nahe beieinander lagen (Fließmittel: Äther). Die späteren Fraktionen ergaben noch ca. 20 mg Gemisch (noch Edukt enthaltend), das nicht weiter verarbeitet wurde. Die obigen 70 mg Rohprodukt

wurden an 10 g Kieselgel nach DUNCAN [12] mit Petroläther-Äther (3:7) als Lösungsmittel chromatographiert. (Fraktionen zu 10 ml.) Aus den Fraktionen 4–7 wurden aus Äther-Petroläther 32 mg Kristalle erhalten. Nach Umkristallisieren aus Äther-Petroläther resultierte reiner Ester **9** in verfilzten Nadeln vom Smp. 176–181° (beginnt bei 170° zu sublimieren). $[\alpha]_D^{21} = +32^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,911$ in Me). Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3) (fest in KBr) Banden bei 3,31 μ (C–H, Epoxid), 5,76 μ (C O, Ester) und bei 8,10 μ (–O–CO–CH₃). Der Misch-Smp. mit einem Präparat von **9**, das durch Abbau von **7** gewonnen worden war (s. unten) war gleich, ebenso das IR.-Spektrum und die Laufstrecke im DC (Fließmittel: Äther).

9. *Abbau von Di-O-acetyl-14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin (7) mit O₃ etc.: 3 β ,12 β -Diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-Ätiansäure-methylester (9).* In eine Lösung von 125 mg **7** vom Smp. 203–212° in 10 ml Essigester (getrocknet durch Filtrieren durch eine Säule mit basischem Al₂O₃) wurde während 10 Min. bei –70° ein 4-proz. O₃/O₂-Gemisch eingeleitet (Geschwindigkeit 100 ml/Min.). Die violettblaue Lösung war auch nach Stehen in der Kälte während 90 Min. noch blau und wurde dann kurz auf 0° erwärmt, worauf sie sich sofort entfärbte. Die wieder auf –70° gekühlte Lösung wurde nochmals während 5 Min. mit dem O₃/O₂-Strom behandelt (Geschwindigkeit 200 ml/Min.) und hierauf 45 Min. in der Kälte stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum bei –10° wurde das rohe Ozonid in 3 ml Eisessig gelöst und mit einem Tropfen H₂O sowie mit Zn-Staub in kleinen Portionen versetzt (leichte Erwärmung). Nach 5 Min. wurde feuchtes KJ-Stärkepapier von der Reaktionslösung nicht mehr gefärbt. Nach 10 Min. wurde filtriert, der Rückstand mit Chloroform nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Md aufgenommen und mit wenig Wasser neutral gewaschen. Das nach Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen resultierende Rohprodukt (120 mg) wurde in 15 ml Me gelöst und mit einer kalt zubereiteten Lösung von 230 mg KHCO₃ in 6 ml H₂O versetzt. Nach 20 Std. Rühren bei 22° wurde das Me im Vakuum entfernt und die wässrige Suspension mit Chloroform-Äther-(9:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 92 mg Rohprodukt (Ketol), das in 16 ml reinstem Me gelöst und mit 16,5 ml NaJO₄-Lösung (zu einer Suspension von 625 mg NaJO₄ in 50 ml Wasser wurden einige Tropfen 2N H₂SO₄ gegeben; pH = 1,5–1,8) versetzt wurde. Nach 3 Std. Stehen im Dunkeln bei 22° wurde das Me im Vakuum entfernt, die Lösung mit 2N H₂SO₄ auf pH 1 gebracht und viermal mit Chloroform-Äther-(3:1) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit wenig Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten ca. 100 mg rohe Ätiansäure, die in Äther gelöst und mit einem knappen Überschuss an frisch bereiteter ätherischer Diazomethanolung versetzt wurde. Nach 15 Min. Stehen wurde eingedampft. Da der rohe Methyl-ester (92 mg) im DC beträchtliche Mengen eines langsamer laufenden Nebenprodukts zeigte, wurde er mit 2,5 ml Acetanhydrid in 3 ml Pyridin versetzt und 16 Std. bei 35° stehengelassen. Nach Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen des Rückstandes in Chloroform, Waschen der Lösung mit 2N HCl, 2N Na₂CO₃-Lösung und Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen im Vakuum war im DC der Fleck des Nebenprodukts verschwunden. Das Rohprodukt (ca. 100 mg) wurde nach DUNCAN [7] an 70 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert. (Fraktionen zu 30 ml.) Die Fraktionen 9–11 ergaben aus Äther 60 mg Kristalle vom Smp. 177–183°. Nach Umkristallisieren aus Äther resultierte reiner Ester **9** in fein verfilzten Nadeln vom Smp. 182–184° (Sublimieren ab 170°). $[\alpha]_D^{24} = +32^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,239$ in Chloroform). Das IR.-Spektrum (in CH₂Cl₂) zeigte Banden bei 5,76 μ (C=O, Ester) und 8,10 μ (–O–CO–CH₃). In KBr war die Bande bei 3,31 μ erkennbar. Der Misch-Smp. mit einem Präparat von **9**, das durch Abbau von **5** gewonnen worden war (s. oben), war gleich, ebenso das Verhalten im DC.

C₂₅H₃₆O₇ (448,54) Ber. C 66,94 H 8,09% Gef. C 67,07 H 8,15%

10. *3 β ,12 β ,14,20-Tetrahydroxy-21-nor-5 β ,14 β -pregnan (10) (Tetrol 10) aus 3 β ,12 β -Diacetoxy-14-hydroxy-5 β ,14 β ,17 α H-Ätiansäure-methylester (12).* Eine Lösung von 200 mg Methyl-ester **12** vom Smp. 185–189° in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran-Äther-(1:1) wurde zu einer Suspension von 400 mg LiAlH₄ in 25 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches getropft. Nach 3 Std. Kochen unter Rückfluss wurde das überschüssige LiAlH₄ mit Eis zerstört, 2N H₂SO₄ bis zur kongosauren Reaktion zugegeben und die Ätherphase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde noch viermal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Äther-Chloroform-Extrakte wurden mit wenig Wasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Es resultierten 120 mg Rohprodukt, das aus Aceton 106 mg Kristalle lieferte. Nach Umkristallisieren reines Tetrol **10** vom Smp. 247–

250°. $[\alpha]_D^{24} = +2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,210$ in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte eine breite, nicht aufgelöste Bande bei 2,96–3,07 μ . (H–O–) und keine C=O-Schwingungen.

$C_{20}H_{34}O_4$ (338,47) Ber. C 70,97 H 10,13% Gef. C 69,90 H 10,10%

11. *3 β ,12 β ,14,20-Tetrahydroxy-21-nor-5 β ,14 β -pregnan (10) (Tetrol 10) aus 3 β ,12 β -Diacetoxy-14,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-ätiensäure-methylester (9).* Eine Lösung von 35 mg **9** vom Smp. 177–183° in 10 ml frisch über basischem Al_2O_3 gereinigtem Äther wurde unter Rühren mit 100 mg $LiAlH_4$ versetzt. Nach 3 Std. Kochen unter Rückfluss wurde das überschüssige $LiAlH_4$ unter Kühlung mit Eis zersetzt und 2N H_2SO_4 bis zur kongosauren Reaktion zugesetzt. Nach Ausschütteln mit Chloroform, Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen resultierten 33 mg Rohprodukt. Aus Aceton 14 mg Kristalle vom Smp. 220–242°, die aber laut DC (Fließmittel Md-Me(85:15)) nicht ganz einheitlich waren. Nach Umkristallisieren aus Aceton wurden 11 mg reines Tetrol **10** vom Smp. 235–247° erhalten. Der Misch-Smp. mit dem aus **12** erhaltenen Präparat war gleich, ebenso die Laufstrecke im DC.

12. *3 β ,12 β ,20-Triacetoxy-14-hydroxy-21-nor-5 β ,14 β -pregnan (11) aus 10.* Eine Lösung von 50 mg Tetrol **10** vom Smp. 247–250° in 1,2 ml abs. Pyridin und 1,0 ml Acetanhydrid wurde 17 Std. bei 40° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand noch 5mal mit Benzol abgedampft. Die 78 mg Rohprodukt wurden an 5 g Silikagel mit Md-Me(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Aus Aceton-Äther wurden 57 mg Kristalle vom Smp. 163–166° erhalten. Nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther reines **11** in Quadern vom Smp. 164–166°. $[\alpha]_D^{24} = +29^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,437$ in Me). Das IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) zeigte Banden bei 2,46 μ (HO); 5,76 μ (C=O, Ester) und 8,05 μ (–O–CO–CH₃).

$C_{26}H_{40}O_7$ (464,6) Ber. C 67,21 H 8,68% Gef. C 66,99 H 8,65%

SUMMARY

Incubation of resibufogenin (**1**) with cultures of *Fusarium lini* (BOLLEY) yielded the unknown 12 β -hydroxyresibufogenin (**4**). The structure of **4** was proved by the degradation of its diacetyl derivative **5** to methyl 3 β ,12 β -diacetoxy-14 β ,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-etianate (**9**) which was identical with the degradation product obtained from 14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digoxigenin diacetate (**7**). The latter was prepared from di-O-acetyl digoxigenin (**8**). Incubation of 14 β ,15 β -epoxy-14-anhydro-digitoxigenin (**2**) with *F. lini* led to the 12 β -hydroxy derivative **6**, its diacetate being identical with **7**. $LiAlH_4$ -reduction of both the epoxyester **9** and the hydroxyester **12** derived from digoxigenin gave the same tetrol **10**.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 11. Mitteilung: E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 2435 (1963).
- [2] Internat. Symposium Chemistry Nat. Products, Kyoto 1964, Abstr. Papers, p. 285.
- [3] CH. TAMM, *Angew. Chem.* **74**, 225 (1962); *ibid.* Internat. Edit. in English **7**, 178 (1962); Y. NOZAKI, *Agr. biol. Chemistry (Jap.)* **25**, 461, 559, 879, 884, 890 (1961); Y. NOZAKI, E. MASUO & D. SATOH, *ibid.* **25**, 399 (1962); H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, *Chem. & pharmaceut. Bull. (Jap.)* **11**, 156 (1963); T. OKUMURA, Y. NOZAKI & D. SATOH, *ibid.* **11**, 1340 (1963); P. BELLET & D. GÉRARD, *Ann. pharmaceut. franc.* **21**, 593 (1963).
- [4] CH. TAMM & A. GUBLER, *Helv.* **42**, 473 (1959).
- [5] CH. TAMM, A. GUBLER, G. JUHASZ, E. WEISS-BERG & W. ZÜRCHER, *Helv.* **46**, 889 (1963); E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 1166 (1963).
- [5a] M. S. RAGAB, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 1794 (1962).
- [6] a) K. MEYER, *Helv.* **35**, 2444 (1952); b) H. LINDE & K. MEYER, *Pharmac. Acta Helv.* **33**, 327 (1958); *Helv.* **42**, 807 (1959).
- [7] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 1041 (1962).

- [8] A. WINDAUS & G. STEIN, Ber. deutsch. Chem. Ges. *61*, 2436 (1928); F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, Helv. *28*, 1472 (1945).
- [9] a) S. SMITH, J. chem. Soc. *1930*, 508; b) M. STEIGER & T. REICHSTEIN, Helv. *27*, 828 (1938); c) S. PATAKI, K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. *36*, 1295 (1953).
- [10] H. HENBEST, G. D. MEAKINS, D. NICHOLLS & K. J. TAYLOR, J. Chem. Soc. *1957*, 1459; H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. *41*, 720 (1958); vgl. auch [6].
- [11] T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, Discuss. Farad. Soc. Nr. 7, 305 (1949).
- [12] G. R. DUNCAN, J. Chromatogr. *8*, 37 (1962).
- [13] Vgl. E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RADERATH, Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- [14] D. LAWDAY, Nature *170*, 415 (1952); P. ZOLLER & CH. TAMM, Helv. *36*, 1744 (1953); H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. *38*, 883 (1955); R. BOLLIGER & K. MEYER, Helv. *40*, 1659 (1957).

249. Umwandlung von Krötengiften (Bufadienoliden) durch Mikroorganismen

III. 12 β -Hydroxymarinobufagin¹⁾

13. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]²⁾

Mit Hilfe mikrobieller Enzyme ist es möglich, neue Bufadienolidderivate zu bereiten, die man auf rein chemischem Wege nicht oder nur über sehr viele Stufen synthetisieren kann. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese neuen Verbindungen oder von ihnen abgeleitete Ester und Glykoside später auch in tierischen oder pflanzlichen Materialien entdeckt werden, womit ihre Identifizierung vereinfacht ist. Ausserdem können diese neuen Stoffe unsere Kenntnisse über die Beziehungen zwischen Konstitution und biologischer Wirksamkeit vertiefen. Nachdem wir in der vorausgegangenen Mitteilung [1] über die 12 β -Hydroxylierung von Resibufogenin mit Kulturen von *Fusarium lini* (BOLLEY) berichtet hatten, beschreiben wir jetzt die Resultate, die bei der Inkubation von Marinobufagin (1) mit dem gleichen Organismus erzielt wurden³⁾. Marinobufagin (1) unterscheidet sich von Resibufogenin lediglich durch eine zusätzliche Hydroxygruppe an C-5 [2].

Da nach den bisherigen Erfahrungen [3] die Hydroxylierungsgeschwindigkeiten mit zunehmender Zahl von HO-Gruppen rasch abnehmen, war es nicht verwunderlich, dass auch bei 1 mit *F. lini* nur eine sehr langsame Reaktion stattfand. Erst bei Zusatz von KCN zur Nährlösung (10^{-3} M KCN) trat in Analogie zu früheren Beobachtungen [4] eine befriedigende Umsetzung ein. Sie wurde wie üblich unter Belüftung in Schüttelkulturen bei 27° vorgenommen. Nach 17 Tagen zeigte das Dünnschichtchromato-

¹⁾ Über diese Untersuchungen wurde am «International Symposium on the Chemistry of Natural Products», Kyoto, Japan, 12.-18. April 1964, berichtet [1a].

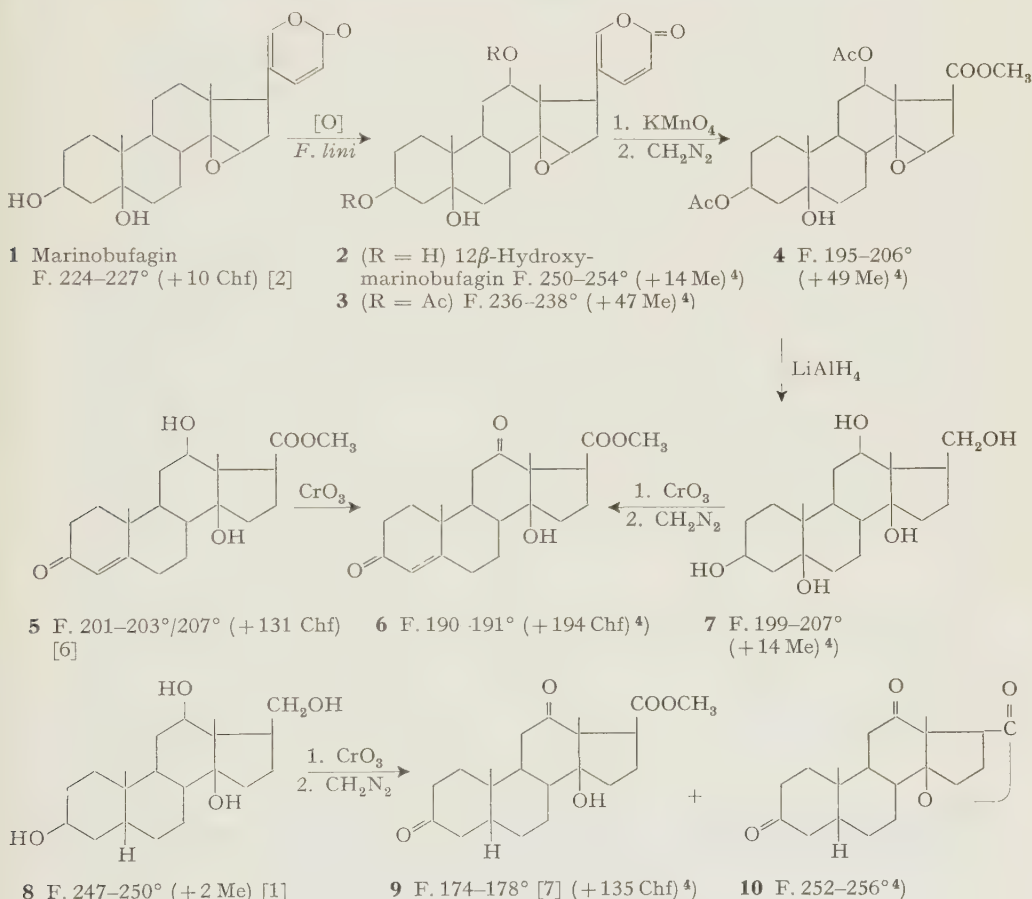
²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 2233.

³⁾ Wir möchten Herrn Prof. Dr. KUNO MEYER, Basel, erneut für die grosszügige Überlassung einer grösseren Menge Marinobufagin danken.

gramm einen neuen starken langsamer laufenden, sowie drei weitere neue schwache Flecke. Nach Chromatographie an Silicagel wurde in 65-proz. Ausbeute ein Stoff vom Smp. 250–254° erhalten, dem wir auf Grund der folgenden Beobachtungen die Konstitution des noch unbekannten 12 β -Hydroxymarinobufagins (**2**) erteilen. Die Analysenwerte passten auf die Formel C₂₄H₃₂O₆. Nach dem UV.-Spektrum (λ_{max} = 298 m μ ; log ϵ = 3,69 und λ_{max} = 195 m μ ; log ϵ = 4,08) war der Cumalinring intakt geblieben. Mit Acetanhydrid in Pyridin bei 37° lieferte **2** das Di-O-acetyl-derivat **3**, dessen IR.-Spektrum (vgl. Fig. 1) u. a. eine HO-Gruppe bei 2,79 μ und bei 3,29 μ die CH-Streckschwingung zeigte, die für das 15 α H-Atom der 14 β , 15 β -Epoxygruppe typisch ist [5].

Zur Abklärung der Stellung des mikrobiologisch eingeführten Hydroxyls wurde das Diacetat **3** mit KMnO₄ abgebaut und der saure Anteil der Reaktionsprodukte mit

Formelschema



Ac = CH₃CO–; Chf = Chloroform; Me = Methanol. Die Zahlen in runden Klammern geben die spez. Drehungen für Na-Licht an.

⁴⁾ Vgl. Exper. Teil dieser Arbeit.

Diazomethan verestert⁵⁾. Es gab zwei Produkte, die sich im Dünnschichtchromatogramm zwar sehr ähnlich verhielten, aber durch wiederholte Chromatographie an der Kieselgelsäule getrennt werden konnten. Als Hauptprodukt wurde der krist. $3\beta, 12\beta$ -Diacetoxy-5-hydroxy-14, 15 β -epoxy-5 $\beta, 14\beta, 17\alpha$ H-ätiensäure-methylester (**4**) erhalten, dessen IR.-Spektrum (vgl. Fig. 2) neben den C O-Streckschwingungen wieder die Hydroxylbande bei $2,79 \mu$ und bei $3,30 \mu$ die CH-Schwingung des Oxiranrings erkennen liess. Das Nebenprodukt der Abbaureaktion konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Es wurde bisher nur amorph, jedoch chromatographisch einheitlich erhalten. Sein IR.-Spektrum glich dem des Esters **4** sehr stark; doch fehlte die CH-Schwingung der 14, 15-Oxidogruppe. Die Anwesenheit einer HO-Gruppe an C-14 oder einer Keto-Gruppe an C-15 ist wegen der normalen Lage der C O-Streckschwingung der 17-Carbomethoxygruppe bzw. des Fehlens der entsprechenden Absorptionsmaxima in den IR.- und UV.-Spektren wenig wahrscheinlich.

Um die Konstitution des Abbauesters **4** zu beweisen, wurde er mit LiAlH_4 reduziert. Es entstand das Pentol **7**, das mit CrO_3 in Eisessig bei 22° unter kontrollierten Bedingungen (s. unten) oxydiert wurde. Die sauren Anteile dieser Reaktion wurden mit CH_2N_2 behandelt, worauf nach chromatographischer Reinigung der 3, 12-Dioxo-14-hydroxy- Δ^4 -14 β -ätiensäure-methylester (**6**) in Kristallen erhalten wurde. Neben der Oxydation der 17-Hydroxymethylgruppe und der Dehydrierung der Hydroxyle an C-3 und C-12 ist auch die erwünschte Elimination des 5-Hydroxyls eingetreten. Der erhaltene Ketoester **6** war nun identisch mit dem Ester, den wir durch Dehydrierung des bekannten 3-Oxo-12 $\beta, 14$ -dihydroxy- Δ^4 -14 β -ätiensäure-methylesters (**5**) mit CrO_3 erhielten⁶⁾. Im IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3) des Esters **6** waren die typischen Absorptionsmaxima aller funktionellen Gruppen erkennbar, nämlich bei $2,93 \mu$ die 14-Hydroxygruppe; bei $5,90 \mu$ die 12-Ketogruppe, überlagert durch die wegen Assoziation mit dem 14 β -Hydroxyl verschobene 17 β -Carbomethoxygruppe (vgl. [8]); bei $5,99 \mu$ das Δ^4 -3-Keton und bei $6,19 \mu$ die Δ^4 -Doppelbindung. Durch diese Verknüpfung ist die 12-Stellung der durch *F. lini* in die Marinobufaginmolekel eingeführten Hydroxylgruppe eindeutig bewiesen. Nicht streng bewiesen, aber auf Grund der zahlreichen bekannten 12 β -Hydroxylierungen von Cardenoliden und Bufadienoliden durch *F. lini* [1] [3] [4] sehr wahrscheinlich, ist die β -Konfiguration dieses Hydroxyls.

Da für die CrO_3 -Oxydation des Pentols **7** nur sehr wenig Material zur Verfügung stand, wurden zuerst die besten Reaktionsbedingungen anhand des Tetrols **8** ermittelt. Sowohl mit $\text{CrO}_3\text{--H}_2\text{SO}_4$ in Aceton nach der Methodik von BOWDEN *et al.* [9] wie auch mit CrO_3 -Eisessig entstand auch bei versch. Temperaturen und Reaktionszeiten neben der gewünschten Ätiensäure immer noch ein Neutralstoff, bei dem es sich um das

⁵⁾ Um die Konstitution von 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) zu beweisen, erwogen wir, den Oxidring mit NaBH_4 nach BHARUCHA *et al.* [19] zu öffnen. Da uns nur sehr wenig Material zur Verfügung stand, verzichteten wir auf entsprechende Versuche, denn bei der Reduktion von Marinobufagin war das gewünschte Telocinobufagin nur in einer Ausbeute von 5,2% erhalten worden [19]. Nach den Papierchromatogrammen waren eine Anzahl weiterer Produkte entstanden, die weder getrennt noch aufgeklärt wurden [19]. Die Reaktion mit NaBH_4 verläuft demnach sehr unübersichtlich.

⁶⁾ Für die Überlassung einer kleinen Probe des Esters **5** sind wir Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN zu Dank verpflichtet.

Diketolacton **10** handeln muss^{6a)}. Sein IR.-Spektrum zeigte neben der C–O-Schwingung bei $5,86\ \mu$ der 3- und 12-Ketogruppe eine weitere bei $5,57\text{--}5,59\ \mu$, die von der γ -Lactongruppe herrührt. Die kleinste Menge dieses Nebenprodukts bildete sich, wenn das Tetrol **8** mit einer 1-proz. CrO_3 -Essigsäurelösung 90 Min. bei 22° stehen gelassen wurde.

Zum Schluss seien noch die Inkubationsversuche erwähnt, die mit Bufotalin [10] Cinobufagin [11] und Cinobufotalin [12] als Substrate durchgeführt wurden. *F. lini* vermochte keine dieser Bufadienolide zu hydroxylieren. Hingegen wurde bei allen die 16-Acetoxygruppe quantitativ hydrolysiert unter Bildung der bekannten Desacetyl-derivate⁷⁾.

Herr Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, war so liebenswürdig, die Toxizität von 12β -Hydroxymarinobufagin (**2**) an der Katze nach HATCHER-BRODY orientierend zu prüfen⁹⁾. Er fand als geometrisches Mittel der letalen Dosis bei zwei Katzen die Werte von

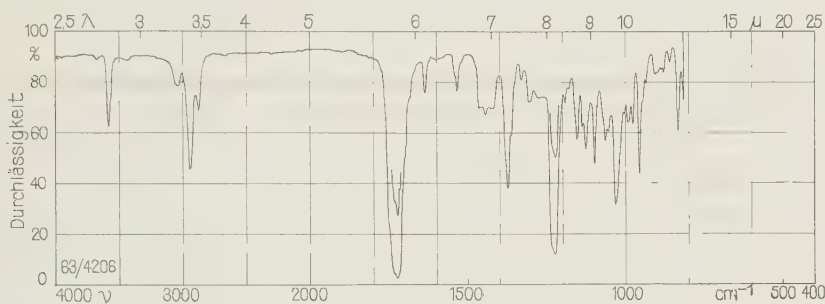


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von 3,12-Di-O-acetyl- 12β -hydroxy-marinobufagin (**3**) in CH_2Cl_2 -Lösung⁸⁾

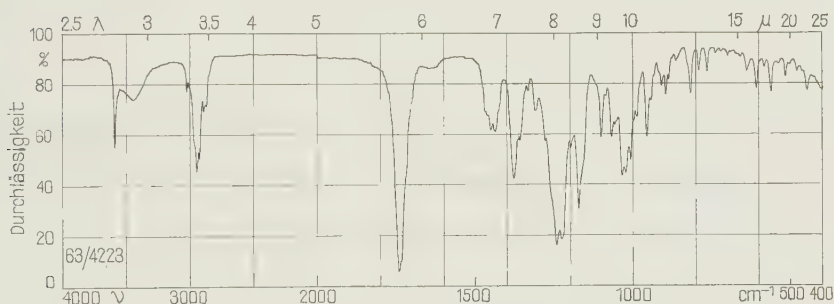


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum des $3\beta,12\beta$ -Diacetoxy-5-hydroxy-14,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-ätiensäure-methylesters (**4**) (fest in KBr)⁸⁾

^{6a)} Die Bildung eines $20 \rightarrow 14$ -Lactons in der Ätiensäurereihe wurde erstmals von LINDE & MEYER [10a] bei der CrO_3 -Oxydation von 3β -Acetoxy-14 β ,20-dihydroxy-21-nor-5 β -pregnan beobachtet (Vgl. auch [10b]).

⁷⁾ Diese Versuche wurden von G. JUHASZ [13] durchgeführt.

⁸⁾ Aufgenommen mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrophotometer, Modell 125 im Spektrollabor unseres Instituts (CH. SENN und W. SCHWAB).

⁹⁾ Wir danken Herrn Dr. K. K. CHEN, Indianapolis, Ind., USA, bestens für die biologische Prüfung.

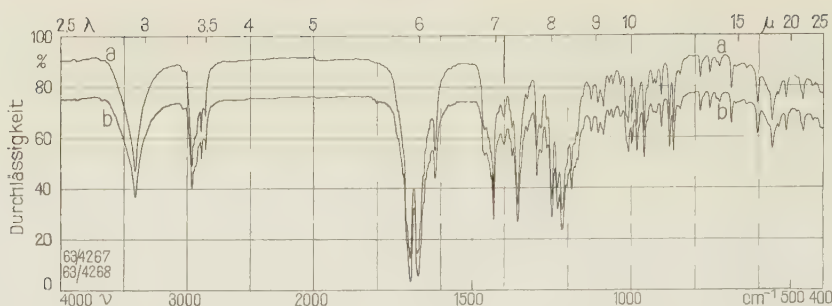


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum des 3,12-Dioxo-14-hydroxy- A^1 -14 β ,17 α H-ätiensäure-methylesters (**6**) (fest in KBr)⁸⁾; Kurve a aus **5**; Kurve b aus **7**

2,663 bzw. 3,35 mg/kg. **2** zeigt demnach eine eindeutige, wenn auch schwache cardio-toxische Aktivität, wobei die für das Marinobufagin (**1**) (geometrisches Mittel der letalen Dosis: 1,489 bis 1,552 [14]) typische Krampfwirkung scheinbar nicht zu beobachten war.

Wir danken dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN (Projekt Nr. 2535) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt und korrigiert; Fehlergrenze etwa $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Messung der Spektren und der spez. Drehungen wurden ca. 1 Std. bei 0,02 Torr/60–70° und zur Elementaranalyse 5 Std. bei 0,01 Torr/110° mit Einwaage im Schweinchen getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (Leitung E. THOMMEN). Die Adsorptions-Chromatographien wurden nach der Durchlaufmethode [15] an Silicagel (SiO_2 , Korngrösse 0,15–0,30 mm) und nach DUNCAN [16] an Kieselgel (SiO_2 , Korngrösse 0,05–0,20 mm) durchgeführt. Dünnschichtchromatographie (DC) mit Kieselgel als Adsorbens nach STAHL [17]. Entwickeln der Flecke durch Besprühen mit 20-proz. SbCl_3 -Lösung in Chloroform [18] oder Sättigen mit J_2 -Dampf. Abkürzungen: Me = Methanol, Md = Methylenchlorid.

2. *Kultur der Mikroorganismen.* Kulturen-Proben einer Schrägagarkultur von *Fusarium lini* (BOLLEY) (Herkunft: CENTRALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, Baarn, Niederlande (CBS)) wurden direkt als Impfmateriel für die Nährlösung verwendet oder zur Sporulierung auf Reismährmedium (13 g polierter Reis und 25 ml Wasser im ERLLENMEYER-Kolben von 500 ml sterilisiert) überimpft. Im letzteren Falle wurde eine wässrige Suspension der drei Wochen alten, bei 27° inkubierten Kulturen als Impfmateriel verwendet. Zum Versuch wurden 100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 20 ml Nährlösung benützt. Die Gefässe wurden 30 Min. bei 120° im Dampfautoklav sterilisiert und dann beimpft. Die ERLLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) bei 27° 3–10 Tage inkubiert, worauf das in Aceton gelöste Substrat nach Sterilfiltration zugegeben wurde.

Nährlösung nach CZAPEK: 30 g Saccharose; 3,0 g NaNO_3 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0,5 g MgSO_4 , 7 H_2O ; 0,5 g KCl und 10 mg FeSO_4 , 7 H_2O mit dest. Wasser ad 1000 ml; pH auf 7,3 eingestellt.

3. *Umsetzung von Marinobufagin (1) mit Fusarium lini.* Eine Lösung von 500 mg Marinobufagin (**1**) vom Smp. 224–227° in 96 ml Aceton wurde, gleichmässig verteilt, steril zu 96 100-ml-ERLENMEYER-Kolben gegeben. Jeder Kolben wurde mit 1 ml einer sterilen Lösung von 156 mg KCN in 120 ml Wasser versetzt (10^{-3}M KCN in Nährlösung). Hierauf wurde 17 Tage bei 27° auf der rotierenden Maschine geschüttelt, dann jeder Kolben mit 5 ml Methanol versetzt und 1 Std. stehengelassen. Es wurde abgenutscht und der Mycelrückstand noch zweimal mit je 400 ml Methanol geschüttelt. Nach Abnutschen wurden die vereinigten Filtrate im Vakuum vom Methanol befreit und auf ca. 600 ml eingeeengt. Die so erhaltene trübe, wässrige Suspension wurde fünfmal mit Chloroform-Äthanol (85:15) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig

Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 720 mg Rohprodukt, das im DC (Fließmittel: Md-Me-(93:7)) einen starken blauschwarzen Fleck von 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) (Rf-Wert 0,15), einen schwachen, rosavioletten Fleck von Marinobufagin (**1**) (Rf-Wert 0,36), sowie drei weitere sehr schwache Flecke mit den Rf-Werten 0,63; 0,22 und 0,02 zeigte. Das Rohprodukt wurde an 35 g Silicagel chromatographiert. Zum Eluieren dienten je 50 ml Lösungsmittel pro Fraktion.

Die Fraktionen 1–6 (eluiert mit Md-Me-(99:1)) ergaben ca. 50 mg gelbes Öl, verworfen.

Die Fraktionen 7–9 (eluiert mit Md-Me-(97:3)) ergaben ca. 60 mg amorphes Material. Nach DC Gemisch von wenig Edukt **1** und verschiedenen Nebenprodukten. Nicht weiter aufgetrennt.

Die Fraktionen 10 und 11 (eluiert mit Md-Me-(97:3)) enthielten noch Edukt **1**, das aber nicht kristallisierte (ca. 30 mg).

Die Fraktionen 12–15 (eluiert mit Md-Me-(95:5)) ergaben 26 mg amorphes Material.

Die Fraktionen 16–19 (335 mg) eluiert mit Md-Me-(94:6) lieferten aus Aceton 327 mg Kristalle vom Smp. 207–211°. Nach Umkristallisieren aus Aceton resultierte reines 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) in Prismen vom Smp. 250–254° (Sintern bei 190°). $[\alpha]_D^{25} = +14^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,140$ in Me). UV.-Spektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 298 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 3,69$ und $\lambda_{\max} = 195 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 4,08$.

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (416,5) Ber. C 69,21 H 7,74% Gef. C 68,96 H 7,71%

4. 3,12-Di-O-acetyl-12 β -hydroxymarinobufagin (**3**) aus **2**. 380 mg 12 β -Hydroxymarinobufagin (**2**) vom Smp. 207–211° wurden mit 6 ml abs. Pyridin und 4 ml Acetanhydrid 22 Std. bei 35° stehengelassen. Hierauf wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand viermal mit Benzol abgedampft. Das resultierende Rohprodukt (ca. 450 mg) wurde an 20 g Silicagel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Aus Aceton-Äther wurden 408 mg Kristalle erhalten, die nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther grobe Quader vom Smp. 236–238° ergaben. $[\alpha]_D^{25} = +47^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,699$ in Me). Das IR.-Spektrum (CH_2Cl_2) (vgl. Fig. 1) zeigte Banden bei 2,79 μ (OH); 3,26–3,30 μ (CH, Epoxid); 5,79 μ (C=O, Acetyl+Cumalinring); 6,11 μ (C=C, Cumalinring) und 8,15 μ (–OCOCH₃).

$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (500,6) Ber. C 67,18 H 7,25% Gef. C 67,28 H 7,26%

5. KMnO_4 -Abbau von 3,12-Di-O-acetyl-12 β -hydroxymarinobufagin (**3**). Eine Lösung von 300 mg **3** vom Smp. 234–237° in 7 ml Aceton (frisch über KMnO_4 destilliert) wurde unter Rühren während 4 Std. portionsweise mit insgesamt 660 mg fein gepulvertem KMnO_4 versetzt (zu Beginn 350 mg unter kurzer Kühlung, nach 15 Min. 160 mg, nach 1 Std. 90 mg, nach 2 Std. 60 mg KMnO_4). Das braun gefärbte Reaktionsgemisch wurde zur Trockne eingedampft, der Rückstand zerrieben, in 40 ml Wasser suspendiert und mit 2N H_2SO_4 auf pH 1 gebracht. Hierauf wurde unter Kühlung SO_2 bis zur völligen Entfärbung eingeleitet und mit Chloroform-Äther-(4:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser und Trocknen über Na_2SO_4 resultierte 270 mg Rohprodukt, das in Äther gelöst und mit ätherischer Diazomethanol-Lösung versetzt wurde. Nach Stehen während 15 Min. wurde eingedampft und der Eindampfrückstand (270 mg) an 15 g Silicagel mit Md-Me-(99:1) als Lösungsmittel chromatographiert (30 ml pro Fraktion).

Die Fraktionen 8–10 ergaben 150 mg amorphes Material, das im DC (Fließmittel: zweimal Äther) neben dem Hauptfleck des Esters **4** einen sehr ähnlich laufenden Begleitfleck zeigte.

Die Fraktionen 11 und 12 lieferten aus Md-Äther 35 mg rohen krist. Ester **4** und 28 mg amorphen Mutterlaugenrückstand, dessen DC noch eine Spur des Nebenprodukts enthielt.

Da schon eine Spur des Nebenprodukts die Kristallisation des Esters **4** verhindert, wurden die Fraktionen 8–10 und der Mutterlaugenrückstand der Fraktionen 11 und 12 vereinigt und dreimal an einer Säule mit 100 g Kieselgel nach DUNCAN mit Md-Me-(99:1), (98:2) und (97:3) als Lösungsmittel chromatographiert. Auf diese Weise konnte jedesmal ein Teil des Esters **4** rein abgetrennt werden. So wurden insgesamt 126 mg reiner 3 β ,12 β -Diacetoxy-5-hydroxy-14,15 β -epoxy-5 β ,14 β ,17 α H-ätiensäure-methylester (**4**) in feinen Nadeln vom Smp. 195–206° erhalten. $[\alpha]_D^{24} = +49^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,218$ in Me). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) (vgl. Fig. 2) zeigte Banden bei 2,78 μ (OH); 3,30 μ (CH, Epoxid); 5,75 μ (C=O, Ester) und 8,05 μ und 8,15 μ (–OCOCH₃).

$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (464,5) Ber. C 64,63 H 7,81% Gef. C 64,65 H 8,00%

Einige Fraktionen enthielten das Nebenprodukt in DC-einheitlicher Form. Es kristallisierte bisher nicht. Das IR.-Spektrum (in KBr) zeigte Banden bei 2,78 μ (OH); 5,75 μ (C=O, Ester) und 8,10 μ (–OCOCH₃). Im UV.-Spektrum (Äthanol) war keine selektive Absorption zu erkennen.

6. *3 β ,5,12 β ,14,20-Pentahydroxy-5 β ,14 β -21-nor-pregnan (7)* aus **4**. Eine Lösung von 40 mg Ester **4** vom Smp. 191–206° in 10 ml abs. Äther und 5 ml Tetrahydrofuran (frisch durch basisches Al_2O_3 filtriert) wurde unter Rühren mit 120 mg LiAlH_4 versetzt und 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde unter Kühlung mit Eis zerlegt, mit 2N H_2SO_4 auf pH 1 gebracht und die Lösung 15mal mit Chloroform-Äthanol-(9:1) ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit wenig Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum resultierten 15 mg Rohprodukt. Die verbliebene wässrige Reaktionslösung und die Waschwasser wurden vereinigt und im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Chloroform extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen der Extrakte im Vakuum wurden noch weitere 20 mg Rohprodukt erhalten. Die vereinigten Rohprodukte lieferten aus Me-Aceton 16 mg rohes krist. Pentol **7**. Die Mutterlauge wurde, nachdem sie mit gleichviel analogem Material aus einem weiteren Reduktionsversuch vereinigt worden war (insgesamt 30 mg), an 2 g Al_2O_3 der Aktivitätsstufe II chromatographiert. Aus den mit Md-Me-(95:5) eluierten Fraktionen kristallisierten noch 10 mg Pentol **7** aus. Nach Umkristallisieren aus Me-Aceton wurde reines Pentol **7** in prismatischen Nadeln, die bei 144–152° Blasen bildeten und bei 162–172° sinterten, erhalten. Bei 199–207° schmolz die Hauptmenge und bei 226–228° der Rest der Kristalle. Dieses Verhalten dürfte auf Einschluss von Aceton in das Kristallgitter beruhen. $[\alpha]_D^{25} = +14^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,726$ in Methanol). Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte neben der breiten Hydroxylbande bei $2,97 \mu$ auch nach intensiver Trocknung immer noch eine C=O-Schwingung bei $5,86 \mu$, die vom eingeschlossenen Aceton herrührt. Sie verschwand, nachdem die Substanzprobe vor der Messung zweimal aus Md und zweimal aus Äther eingedampft worden war.

7. *3,12-Dioxo-14-hydroxy- Δ^4 -14 β ,17 α H-ätiensäure-methylester (6)* aus **7**. Eine Lösung von 30 mg Pentol **7** vom Smp. 199–226° in 4 ml Eisessig wurden portionsweise mit insgesamt 2,5 ml 1-proz. CrO_3 -Essigsäurelösung (Lösung: 250 mg CrO_3 in ca. 1 ml Wasser heiss gelöst und mit reinstem Eisessig auf 25 ml verdünnt) versetzt (Zugabe der Portionen nach 3, 10, 20 und 50 Min.). Nach Stehen während 1,5 Std. bei 22° wurde mit 6,5 ml Wasser versetzt und viermal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherextrakte wurden mit Wasser, einmal mit 2N NaOH und dreimal mit 2N Na_2CO_3 -Lösung und mit Wasser ausgeschüttelt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Es resultierten 2 mg neutrale Anteile (nicht untersucht). Die NaOH- und Na_2CO_3 -Lösungen wurden vereinigt, mit 2N H_2SO_4 bis zur kongosauren Reaktion versetzt und sechsmal mit Md ausgeschüttelt. Nach Waschen der Auszüge mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum wurden 10 mg saure Anteile erhalten, die in Äther gelöst und mit ätherischer Diazomethanolösung versetzt wurden. Nach 15 Min. wurde eingedampft und das Rohprodukt an 8 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert (4 ml pro Fraktion). Aus den Fraktionen 7–13 wurden aus Md-Äther 3,0 mg Ester **6** in prismatischen Nadeln vom Smp. 183–186° erhalten. Die 1,6 mg Mutterlaugenrückstände enthielten praktisch reinen Ester **6**.

Die ursprüngliche saure Reaktionslösung wurde im KUTSCHER-STEUEDEL-Apparat mit Äther nachextrahiert. Das nach Eindampfen erhaltene Rohprodukt (10 mg) wurde mit ätherischer Diazomethanolösung versetzt und nach 15 Min. eingedampft. Der Rückstand zeigte im DC nur Flecke, die langsamer als der Ester **6** wanderten. Das gesamte Material wurde deshalb mit 2 ml Eisessig 20 Min. unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde eingedampft, der Rückstand mit Chloroform versetzt, die Lösung mit 2N Na_2CO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Eindampfrückstand (11 mg) enthielt nach dem DC etwas Ester **6**. Er wurde zusammen mit den oben erhaltenen Mutterlaugenrückständen an 6 g Kieselgel mit Äther als Lösungsmittel chromatographiert. Aus den Fraktionen 9–12 wurden so noch 1,7 mg Ester **6** vom Smp. 183–187° erhalten. $[\alpha]_D^{21} = +194 \pm 5^\circ$ ($c = 0,382$ in Chloroform) (zusammen mit Präparat aus **5**). Das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3) zeigte u. a. Banden bei $2,93 \mu$ (OH); $5,90 \mu$ (C=O, 12-Keto + 17-Carbomethoxy); $5,99 \mu$ (Δ^4 -3-Keton) und $6,19 \mu$ (Δ^4). Der Misch-Smp. mit dem aus dem Ester **5** gewonnenen Präparat war gleich, ebenso die Laufstrecke im DC und das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3).

$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_5$ (360,4) Ber. C 69,97 H 7,83% Gef. C 70,39 H 8,03%

8. *3,12-Dioxo-14-hydroxy- Δ^4 -14 β ,17 α H-ätiensäure-methylester (6)* aus **5**. Eine Lösung von 2,8 mg vom 3-Oxo-12 β ,14-dihydroxy- Δ^4 -14 β ,17 α H-ätiensäure-methylester (**5**) vom Smp. 201–203/207°⁶) in 0,5 ml reinstem Eisessig wurde unter starkem Rühren mit insgesamt 0,07 ml 1-proz. CrO_3 -Eisessiglösung in 4 Portionen versetzt und 75 Min. bei 22° stehengelassen (CrO_3 noch nachweisbar). Hierauf wurde mit 3 ml Wasser verdünnt und die Reaktionslösung dreimal mit Äther

ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen ergaben nach Waschen mit 2N H_2SO_4 , 2N Na_2CO_3 -Lösung und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen 3,0 mg Rohprodukt, das an 1,5 g Kieselgel mit Md-Me-(99:1) chromatographiert wurde (5 ml Lösungsmittel pro Fraktion). Aus den Fraktionen 8 und 9 wurde aus Md-Äther 2,7 mg reiner Ester **6** in Nadeln vom Smp. 190–191° erhalten. Der Misch-Smp. mit einem Präparat bereitet aus **7** war gleich, ebenso die Laufstrecke im DC und das IR.-Spektrum (vgl. Fig. 3). Das Material wurde deshalb mit dem dort erhaltenen zur Bestimmung der spez. Drehung und der C, H-Analyse vereinigt.

9. *CrO₃-Oxydation von 3 β , 12 β , 14, 20-Tetrahydroxy-5 β , 14 β -21-nor-pregnan (8)*. Eine Lösung von 25 mg Tetrol **8** vom Smp. 242–248° in 2,5 ml reinstem Eisessig wurde portionsweise mit insgesamt 2,0 ml 1-proz. CrO_3 -Eisessiglösung unter Rühren versetzt und 90 Min. bei 22° stehengelassen (CrO_3 noch nachweisbar). Hierauf wurde mit 6 ml Wasser verdünnt und die Reaktionslösung dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen wurden viermal mit 2N Na_2CO_3 -Lösung ausgeschüttelt, mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das rohe Neutralprodukt (7 mg) wurde an 5 g Kieselgel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Es wurden so aus Aceton-Äther 2 mg reines *Lacton 10* in Nadeln vom Smp. 252–256° erhalten. Das IR.-Spektrum (fest in KBr) zeigte Banden bei 5,57–5,59 μ (C=O, γ -Lacton) und 5,85 μ (C=O, 3,12-Diketon). – Die obigen Na_2CO_3 -Lösungen wurden mit konz. H_2SO_4 auf pH 1 gebracht und mit Äther ausgeschüttelt. Nach Waschen der Ätherlösungen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen wurde der Rückstand mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt, 15 Min. stehengelassen und eingedampft. Das Rohprodukt (17 mg) wurde an 8 g Kieselgel mit Md-Me-(98:2) als Lösungsmittel chromatographiert. Aus Md-Äther wurde reiner 3,12-Dioxo-14-hydroxy-5 β , 14 β , 17 α H-äliansäure-methylester (**9**) in Nadeln vom Smp. 172–177° erhalten. $[\alpha]_D^{23} = +135 \pm 2^\circ$ ($c = 0,842$ in Chloroform). Literaturwert [7]: Smp. 174–178°, keine Drehung bekannt.

SUMMARY

Incubation of marinobufagin (**1**) with cultures of *Fusarium lini* (BOLLEY) gave the unknown 12 β -hydroxymarinobufagin (**2**). The structure of **2** was proved by the degradation of its diacetyl derivative **3** to methyl 3,12-dioxo-14-hydroxy- Δ^4 -14 β , 17 α H-etianate (**6**) which was prepared from the known methyl 3-oxo-12 β , 14-dihydroxy- Δ^4 -14 β , 17 α H-etianate (**5**).

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 12. Mitteilung: M. SCHÜPBACH & CH. TAMM, *Helv.* **47**, 2217 (1964).
- [1a] Internat. Symposium Chemistry nat. Products, Kyoto 1964, Abstr. Papers, p. 285.
- [2] S. PATAKI & K. MEYER, *Helv.* **38**, 1631 (1955); H. SCHRÖTER, R. REES & K. MEYER, *Helv.* **42**, 1385 (1959).
- [3] Vgl. CH. TAMM, *Angew. Chem.* **74**, 225 (1962); *ibid.* International Edition in English **1**, 178 (1962).
- [4] E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* **46**, 1166 (1963).
- [5] H. SCHRÖTER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **41**, 720 (1958).
- [6] J. v. EUW & T. REICHSTEIN, *Helv.* **46**, 142 (1963).
- [7] M. STEIGER & T. REICHSTEIN, *Helv.* **21**, 828 (1938).
- [8] W. SCHLEGEL & CH. TAMM, *Helv.* **40**, 160 (1957).
- [9] Vgl. K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc.* **1946**, 39.
- [10] K. MEYER, *Helv.* **32**, 1993 (1949).
- [10a] H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **42**, 807 (1959).
- [10b] A. LARDON & T. REICHSTEIN, *Helv.* **45**, 949 (1962).
- [11] P. HOFER, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **43**, 1955 (1960).
- [12] F. BERNOULLI, H. LINDE & K. MEYER, *Helv.* **45**, 240 (1962).
- [13] Dissertation G. JUHASZ, Basel, 1961.

- [14] H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 883 (1955).
- [15] T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).
- [16] G. R. DUNCAN, *J. Chromatogr.* **8**, 37 (1962).
- [17] Vgl. E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANERATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1962.
- [18] D. LAWDAY, *Nature* **170**, 415 (1952); P. ZOLLER & CH. TAMM, *Helv.* **36**, 1744 (1953); H. R. URSCHELER, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* **38**, 883 (1955); R. BOLLIGER & K. MEYER, *Helv.* **40**, 1659 (1957).
- [19] M. BHARUCHA, H. JÄGER, K. MEYER, T. REICHSTEIN & O. SCHINDLER, *Helv.* **42**, 1395 (1959).

Curriculum vitae

Am 7. Mai 1937 wurde ich, MARTIN RUDOLF SCHÜPBACH, als Sohn des Ernst Schüpbach, Revisor, und dessen Gattin Mathilde, geb. Zinsstag, in Basel geboren.

Nach 9 Jahren Rudolf-Steiner-Schule (1945–1953) wechselte ich 1953 ins Mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium (Basel), wo ich im Frühling 1957 die Maturität des Typus C bestand.

Im Sommersemester 1957 immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, wo ich nach den beiden Vordiplomprüfungen (Nebenfächer: Zoologie und Botanik) im Frühjahr 1962 das Chemiker-Diplom bestand.

Im späten Sommersemester 1962 begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ch. Tamm die vorliegende Dissertation.

Meine Ausbildung an der Universität Basel verdanke ich den folgenden Herren Dozenten: K. Bernhard, M. Brenner, P. Buchner, H. Erlenmeyer, S. Fallab, M. Geiger-Huber, C. A. Grob, P. Huber, W. Kuhn, H. Labhart, E. Miescher, M. Monnier, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, Ch. Tamm und R. Wizinger.

